

RICERCHE SUL " CALORE ROSSO "

DELLE PELLI SALATE

V. Su di un caso di depigmentazione degli alofli cromogeni precedentemente isolati e descritti

Nota relativa ad un gruppo di ricerche eseguite con il contributo del Dipartimento di Agricoltura U. S. A. (Legge Pubblica 480).

Estratto dal « Bollettino della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti »
Vol. XXXIX - Agosto 1963 N. 4

R i a s s u n t o

Si è accertato che la depigmentazione dei germi alofili, specifici del « calore rosso » su pelli bovine salate, non è causata dai seguenti fattori ambientali: esaurimento di O_2 , perdita di umidità relativa ambiente, influenza della luce, presenza di un principio litico.

Essa potrebbe suporsi legata alla liberazione, nel substrato colturale, di uno o più fattori che interferiscono nella pigmentogenesi degli alofili; altra ipotesi attendibile è che il precursore che regola la formazione del pigmento possa essere stato inattivato.

Ci si riserva di condurre ulteriori indagini al riguardo.

R é s u m é

On a assuré que la dépigmentation des microbes halophiliques du « rougissement » sur les peaux salées de boeuf, n'est pas causée par les facteurs du milieu: épuisement de l'oxygène, déperdition de l'humidité relative du milieu, influence de la lumière, présence d'un facteur lytique.

Il peut être que cette dépigmentation est liée à la libération d'un facteur ou de plusieurs facteurs qui interfèrent sur la pigmentogénèse des microbes halophiliques, dans le milieu de culture; une autre hypothèse à prendre en considération c'est que le précurseur qui règle la formation du pigment peut avoir été inactivé.

Nous nous réservons de conduire des recherches ultérieures à cet égard.

S u m m a r y

It has been ascertained that depigmentation of the halophilic germs which are specific of « Red Heat » on salted bovine hides is not caused by the following surrounding factors: O_2 exhaustion, loss of environmental relative humidity, influence of light, presence of lithic agent.

This depigmentation could be assumed as connected with the release, in culture substrate, of one or more factors interfering with pigmentogenesis of the halophilic germs; another reliable hypothesis is that the precursor governing the occurrence of pigment may have been inactivated.

Further investigations will be conducted in this respect.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die beobachtete Entpigmentierung der halophilen Bakterien, die spezifisch für dem Rotwerdens auf gesalzener Rohhäute beantwortlich sind, wird offenbar nicht von umweltlichen Faktoren verursacht, wie die O_2 -Erschöpfung, Feuchtigkeitsverlust der Umgebung, Lichteinflüsse, Anwesenheit eines Lythischen Mittel.

Diese Entfärbung könnte vielmehr einer Befreiung— in der Entwicklungssubstrate— eines bzw. mehrere Faktoren zugeschrieben werden, die die Pigmentogenesis der Halophilen verhindern; eine weitere gut bedenkliche Ursache könnte wohl diejenige, bei der ein Vorläufer der die Pigmentbildung steuert, inaktiviert wurde.

Weitere Untersuchung über diesem Thema werden bald fortgesetzt.

P r e m e s s a

Le indagini su cui riferiamo hanno tratto origine da alcune constatazioni effettuate sui germi alofili cromogeni isolati da pelli bovine Packers e caratterizzati tassonomicamente (1-6), i quali germi, allevati su agar pappa di patata salata sec. Formisano (2) in fiasche di Roux e queste conservate costantemente in termostato a $37^\circ C$. (anche quando le patine colturali si presentavano ormai bene sviluppate e fortemente arrossate), dopo 30-40 giorni manifestavano fenomeni di scolorazione certamente in conseguenza della interferenza di cause ambientali (dato che il fenomeno, in maniera pressochè identica, era comune a tutti i ceppi), ma le predette cause non erano individuabili estemporaneamente.

Ciò che, nel contempo, attirava la nostra attenzione era rappresentato dal fatto che effettuando i rispettivi trapianti delle patine divenute incolori, su un substrato di identica composizione, i germi si risviluppavano normalmente con la tipica colorazione rossa ma, col procedere dell'incubazione, il fenomeno della scolorazione si ripeteva esattamente come detto in precedenza.

Abbiamo voluto indagare sul fenomeno, supponendo che il suo verificarsi potesse essere legato a qualcuno dei fattori dell'ambiente e ciò ci sembrava suffragato dal fatto che la depigmentazione non si manifestava, anche a distanza di tempo, se le colture, intorno al 10° giorno di incubazione, venivano sottratte al termostato e conservate in armadio da collezione.

Si è reso, pertanto, necessario stabilire innanzitutto se si evidenziavano

oppur non, modificazioni nei caratteri tassonomici delle singole specie, passando poi all'esame dei seguenti fattori:

- 1°) esaurimento di O_2 dall'interno delle fiasche;
- 2°) perdita di umidità relativa dall'ambiente;
- 3°) influenza della luce;
- 4°) presenza, nel substrato di coltura, di un principio litico.

Materiale e tecniche

I ceppi impiegati erano rappresentati da trapianti di patine microbiche da agar sale sec. Anderson (7), vecchie di un mese.

Le specie erano quelle da uno di noi (2) precedentemente isolate da pelli Packers affette da « calore rosso » e, precisamente: *Halobacterium halobium* (Petter) Elazari-Volcani (ceppo n. 13), *Halobacterium cutirubrum* (Lochh.) Elazari-Volcani, var. *thermophilum* Formisano (ceppo n. 14), *Sarcina litoralis* Poulsen (ceppo n. 17), *Micrococcus Riccardi* Form. (ceppo n. 81), *Halobacterium cutirubrum* (Lochh.) Elazari-Volcani (ceppo n. 82), *Micrococcus morrhuae* Klebahn, var. *lipolyticus* Form. (ceppo n. 105), *Halobacterium trapanicum* (Petter) Elazari-Volcani (ceppo n. 136), *Micrococcus morrhuae* Klebahn, var. *denitrolipolyticus* Form. (ceppo n. 150), *Halobacterium cutirubrum* (Lochh.) Elazari-Volcani, var. *proteoliticum* Form. (ceppo n. 157), *Halobacterium Simoncini* Form. (ceppo n. 185), *Halobacterium Simoncini* Form., var. *neapolitanum* Form. (ceppo n. 202).

Il substrato di base era costituito da agar pappa di patata salata sec. Formisano (2) distribuito, in ragione di 200 cc, in fiasche di Roux.

Per lo studio delle modificazioni dei caratteri tassonomici delle singole specie abbiamo eseguito indagini morfologiche, fisiologiche, colturali, biochimiche, nonché prove di reinfezione su pelle, estendendo le indagini stesse sia ai germi che mantenevano inalterata la tipica colorazione rossa, sia a quelli che avevano presentato il fenomeno della depigmentazione.

Per lo studio dell'esaurimento di O_2 dall'interno delle fiasche abbiamo operato come segue:

Tre serie di fiasche insemenate sono state rispettivamente mantenute:

a) una serie, in condizioni ordinarie in termostato a ventilazione forzata e a $37^\circ C.$;

b) una, in anaerobiosi relativa [in apparecchi di Majmone in cui era stato sostituito l'originario coperchio, con altro in bronzo pesante, munito di un sol foro con rubinetto a T per il collegamento fra di loro ed alla pompa pneumatica e leggendo la depressione su un manometro a mercurio identico a quello dell'attrezzatura di Meyer e Bredeman, posto al fondo della campana di vetro di uno degli apparecchi], con una tensione

di 15,30 mg di $O_2/1$ [tenendo conto che la tensio-resistenza dei germi precedentemente accertata (2,3) oscillava da 13,61 a 19,27], e parimenti in termostato a ventilazione forzata e a $37^\circ C.$;

c) una, sotto insufflazione di O_2 reso sterile attraverso candele Berkefeld W, ad una pressione di 0,1 atm., ed egualmente in termostato come per le serie precedenti.

Per la ricerca dell'influenza dell'umidità relativa dell'ambiente abbiamo insemato due serie di fiasche di cui una è stata mantenuta in termostato a secco e a ventilazione forzata, mod. Uniterm CNT/90 e l'altra in un termostato ad umidificazione, senza ventilazione, mod. 506 della Electric Hotpack Comp. Inc., registrando la curva dell'umidità relativa, previo collegamento delle fiasche tra di loro e l'insieme con una campana contenente un igrometro a registrazione.

Altre due serie di fiasche preparate come sopra e collegate tra loro e con l'igrografo, sono state tenute nel termostato ad umidificazione, una, costantemente a 75% di umidità [tenendo conto che l'optimum per i germi, come accertato in precedenza (2, 3), oscillava tra 65 e 85%] e l'altra, costantemente a 50% di umidità relativa.

Per lo studio dell'influenza della luce, una serie di fiasche è stata tenuta all'oscuro a $37^\circ C.$ ed a 75% di umidità relativa e l'altra in una camera ad aria condizionata (a $37^\circ C.$ e col 75% di umidità) e illuminata a giorno.

Per la ricerca della presenza di un probabile principio litico, abbiamo preparato un brodo-sale sec. Anderson (7) con l'aggiunta dell'1% di cloruro di calcio ; effettuato l'inseminamento coi nostri alofili ed incubato a $37^\circ C.$, ogni 5 giorni, dopo avere stabilita spettrofotometricamente la curva di crescita, il brodo veniva sottoposto a filtrazione attraverso filtro Berkefeld N.

10 cc di filtrato sterile venivano addizionati a 90 cc di brodo-sale con cloruro di calcio ed insemato coi singoli alofili, ripetendo l'operazione 20 volte per un totale di 100 giorni e, ben s'intende, eseguendo ogni volta determinazioni spettrofotometriche di crescita.

Una seconda serie di esperienze veniva effettuata come ora detto, ma con un intervallo di 20 giorni tra una filtrazione e l'altra, per un totale di 5 prove. Infine, da una ulteriore serie di brodo-sale con cloruro di calcio, solo dopo 100 giorni dall'inseminamento e per una volta soltanto, si eseguiva la filtrazione ed il filtrato veniva sottoposto al prosieguo delle indagini nelle stesse condizioni surriferite.

Risultati.

Lo sviluppo microbico (sia come curva di crescita, sia per intensità di colore) è risultato sempre normale allorché sono stati effettuati i

trapianti delle patine divenute incolori su un identico substrato di preparazione estemporanea, come appare dai valori turbidimetrici riportati in tabella 1.

T A B E L L A N. 1

Ceppi	da patine pigmentate		da patine incolori		N o t a
	al tempo 0	alla 288 ^a ora	al tempo 0	alla 288 ^a ora	
N. 13	93,4	25,6	97,5	28,2	Substrato impiegato: decotto di pappa di patata salata (2) Letture spettrofotometriche al Beckman, mod. D. U., a 605 m μ (valori della trasmissione)
N. 14	97,6	22,8	98,1	21,5	
N. 17	99,4	17,9	98,6	22,0	
N. 81	89,9	18,5	95,4	23,2	
N. 82	99,1	21,5	89,6	17,4	
N. 105	97,6	18,0	99,1	23,4	
N. 136	86,5	27,2	88,9	31,5	
N. 150	92,8	21,6	90,4	28,6	
N. 157	96,6	23,4	98,5	22,0	
N. 185	89,1	17,5	99,3	30,8	
N. 202	91,6	21,0	87,9	27,5	

Le determinazioni morfo-fisiologiche e biochimiche eseguite sui germi scolorati non hanno messo in evidenza alcuna significativa differenza dei caratteri specifici rispetto a quelli posseduti dalle cellule normalmente pigmentate.

In tab. 2 sono raggruppati i valori delle suddette determinazioni:

Le prove di reinfezione su pelli (partendo sempre dalle patine incolori) hanno dato egualmente risultato positivo sia per quanto riguarda il riprodursi dell'infezione, sia per quanto concerne le caratteristiche macroscopiche del « calore rosso », a confronto delle infezioni provocate dai germi le cui patine colturali si conservavano sempre fortemente pigmentate.

T A B E L L A N. 2

Ceppi	da patine pigmentate										da patine incolori											
	sviluppo					assimilazione					sviluppo					assimilazione						
	Forma	su agar-sale	su agar pappapate sale	aminoacidi (*)	idрати di carbonio (**)	Caseinolsi	Gelatinolsi	Lipolsi	Produzione NH ₃	Riduzione NO ₃	Prove di reinfezione su pelle	Forma	su agar-sale	su agar pappapate sale	aminoacidi (*)	idрати di carbonio (**)	Caseinolsi	Gelatinolsi	Lipolsi	Produzione NH ₃	Riduzione NO ₃	Prove di reinfezione su pelle
N. 13	pl	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	pl	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 14	b	jr	rs	-	+	+	+	+	+	+	pl	r	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 17	q	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	s	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 81	c	rp	irs	+	+	+	+	+	+	+	c	rp	irs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 82	b	jr	r	+	+	+	+	+	+	+	b	jr	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 105	pl	jr	rp	-	+	+	+	+	+	+	pl	jr	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 136	q	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	c	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 150	c	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	c	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 157	q	rp	rs	+	+	+	+	+	+	+	b	jr	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 185	b	irs	rs	+	+	+	+	+	+	+	b	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. 202	b	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	b	rs	rs	+	+	+	+	+	+	+	+	+

NOTA : (*) brodo-sale addizionato di un miscuglio di glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, prolina, istidina, tirosina (0,01% di ognuno).

(**) la prova è stata eseguita su brodo-sale addizionato di fruttosio (a sinistra) e di saccarosio (a destra) in quanto nelle prove già condotte (2), il primo non era stato mai assimilato dai nostri alofili, il secondo invece pressoché sempre intensamente.

pl = pleomorfo, b = batterio, s = sarcina, c = cocco.

rs = rosea, jr = jaino-rosa, rp = rosa-pallido, irs = rosea-rossa, r = rosea.

Per le altre prove si sono utilizzate le metodiche indicate in precedenza (2).

Nella tab. 3 sono riuniti, invece, i risultati delle prove istituite per stabilire se la depigmentazione fosse legata o meno all'esaurimento di O_2 dall'interno delle fiasche.

T A B E L L A N. 3

Ceppi	SVILUPPO MICROBICO			Colorazione delle patine					
	1	2	3	al 15° giorno			al 40° giorno		
				1	2	3	1	2	3
N. 13	89,7 - 21,0	93,2 - 19,5	98,2 - 19,5	rp	r	rs	a	j	j
N. 14	93,4 - 36,1	90,8 - 37,5	95,4 - 11,0	r	r	r	j	j	j
N. 17	98,5 - 23,7	97,4 - 28,6	99,1 - 16,4	rs	r	rs	a	a	rj
N. 81	99,2 - 38,4	95,6 - 29,1	89,4 - 10,2	rp	rs	rs	j	r	rj
N. 82	93,0 - 22,1	98,5 - 30,4	94,3 - 37,4	rs	rs	r	r	rj	j
N. 105	96,5 - 19,4	91,9 - 25,3	89,7 - 13,4	r	rs	rp	j	r	j
N. 136	89,2 - 14,6	97,5 - 17,9	96,6 - 18,5	rs	rs	rs	rj	r	j
N. 150	100,0 - 33,9	99,1 - 24,6	89,9 - 22,1	rp	r	rs	j	j	rj
N. 157	99,1 - 34,5	89,7 - 16,2	99,3 - 19,4	r	rp	rs	a	a	j
N. 185	89,9 - 26,4	98,3 - 13,7	87,6 - 9,2	r	r	r	a	j	j
N. 202	100,0 - 23,1	99,4 - 21,8	98,9 - 13,4	r	r	rp	a	j	rj

NOTA: 1 = terreno nutritivo: decotto di pappa di patata salata; temperatura di incubazione 37°C.; umidità relativa ambiente: 75%; tensione: pressione atmosferica normale; letture spettrofotometriche al tempo 0 e al 12° giorno (valori della trasmissione).

2 = come in 1, ma in anaerobiosi relativa con una tensione di 15,30 mg di O_2 /l.

3 = come in 1, ma con una pressione di 0,1 atm. di O_2 sterile.

r = rosa; rs = rossa; rp = rosso-porpora; a = ambrata; j = jalina.

Pertanto deve dedursi che la microaerobiosi e l'insufflazione di O₂ non hanno significativamente interferito sulla conservazione del pigmento. Al 40° giorno infatti le patine microbiche originariamente rosse si sono depigmentate.

Anche per quanto concerne la variazione dell'umidità relativa dell'ambiente non si sono evidenziate differenze apprezzabili, per cui riteniamo debba escludersi che l'evaporazione dell'acqua sia il fattore predisponente alla depigmentazione dei nostri alofili cromogeni. Sono infatti risultati senza influenza sulla scolorazione, l'abbassamento o l'innalzamento dell'umidità relativa dell'ambiente, anche se col 50% di umidità lo sviluppo microbico è stato in genere relativamente più stentato.

Una lievissima azione è stata esercitata dalla luce la quale ha intensificato la pigmentazione di tutti gli alofili utilizzati, mentre l'oscurità ha fatto sviluppare patine microbiche con una colorazione rossa meno marcata, tendente, in genere, al rosa-carnicino.

Altrettanto dicasi per quanto concerne la conservazione all'oscuro di dischi di pelle precedentemente infettati coi singoli germi, i quali dischi, dopo essere stati mantenuti in condizioni ordinarie alla luce del giorno (per un totale di 100 giorni) furono conservati all'oscuro per altri 100 giorni. Alla fine della prova i dischi presentavano le medesime colorazioni modificate, come sopra indicato.

Circa infine l'isolamento di un eventuale principio litico, nella tab. n. 4 riassumiamo i risultati conseguiti.

T A B E L L A N. 4

Ceppi	RICERCA DI UN PRINCIPIO LITICO			N O T A
	A	B	C	
N. 13	81,6 - 29,6	86,0 - 25,0	89,0 - 29,9	A = media aritmetica di 20 letture spettrofotometriche eseguite ogni 5 giorni (v. tecnica) rispettivamente al tempo 0 e alla 120 ^a ora. (valori della trasmissione)
N. 14	80,6 - 34,2	88,5 - 37,7	94,6 - 31,5	
N. 17	79,0 - 31,6	89,5 - 26,6	87,9 - 29,9	
N. 81	81,4 - 32,6	88,5 - 31,0	79,5 - 20,0	
N. 82	77,6 - 24,6	86,5 - 24,0	98,0 - 32,5	
N. 105	70,6 - 12,8	83,5 - 23,0	80,8 - 28,5	
N. 136	80,6 - 27,4	85,7 - 24,7	91,7 - 27,4	
N. 150	78,5 - 25,2	84,0 - 23,5	78,9 - 25,0	
N. 157	72,5 - 21,2	77,2 - 20,0	92,4 - 39,8	
N. 185	76,4 - 18,5	81,5 - 23,0	80,2 - 20,0	
N. 202	69,6 - 15,4	76,5 - 17,0	79,9 - 22,5	B = media aritmetica di 5 letture spettrofotometriche eseguite ogni 20 giorni, rispettivamente al tempo 0 e alla 480 ^a ora. (valori della trasmissione)
				C = lettura al tempo 0 e alla 240 ^a ora. (valori della trasmissione)

Da essi si desume che lo sviluppo degli alofili, ottenuto in presenza di filtrati sterili che avrebbero potuto contenere un eventuale principio litico, è stato pressochè conforme ai valori normali di crescita.

Conclusioni

La scolorazione delle patine microbiche degli alofili cromogeni isolati da pelli Packers infette da « calore rosso » non è legata, pertanto, ad alcuno dei fattori presi in considerazione nella presente nota e sopra esposti.

Riteniamo, allora, possa supporre, in base ai risultati sperimentali fin qui ottenuti, che:

1°) In seguito al metabolismo dei germi, dal substrato costituito da pappa di patata salata su cui il fenomeno della depigmentazione è stato osservato, si possa liberare qualche fattore che interferisca nella pigmentogenesi degli alofili mercè un meccanismo che possa essere interpretato a mo' di azione solvente, blanda però, nel senso che influenzerebbe soltanto la cromogenesi, rispettando le altre attività metaboliche. Tutto ciò tenendo conto che nelle precedenti note (2, 3) abbiamo osservato che i pigmenti una volta estratti con solventi a funzione alcoolica, ovvero eterea, dopo un contatto in essi di 12-24 ore si trasformavano in leucoderivati ;

2°) che il fenomeno suddetto si evidenzia solo allorquando si conservano i ceppi sempre in termostato in quanto ivi il substrato subisce, per effetto del soggiorno prolungato oltre il normale tempo di incubazione, una più spinta degradazione dei suoi costituenti nutritivi rispetto al substrato (con le rispettive colture) posto in armadio da collezione ;

3°) che la depigmentazione possa essere legata all'esaurimento del precursore che condiziona la formazione del pigmento e che inoltre influenza il ruolo fisiologico del medesimo, in natura.

Su quanto abbiamo presunto ci riserviamo di condurre ulteriori indagini.

*Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli
e delle Materie Concianti. Napoli - Torino.*

*Istituto di Microbiologia agraria e tecnica
dell'Università degli Studi di Napoli.*

B I B L I O G R A F I A

- 1) FORMISANO M.: Ricerche sul « calore rosso » delle pelli salate. - Nota I. *Boll. Staz. Sperim. Industria Pelli e Materie concianti*, vol. 38, n. 1, 1962, p. 11.
- 2) FORMISANO M.: Ricerche sul « calore rosso », ecc. - Nota II. Isolamento e caratterizzazione degli agenti microbici causanti l'alterazione. *Boll. Staz. Sperim. Industria Pelli e Materie concianti*, vol. 38, nn. 2 e 3, 1962, p. 100 e p. 183.